

Mestrado em Segurança e Qualidade Alimentar em Restauração
3ª Edição

Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril



Avaliação da Qualidade Microbiológica de Produtos Prontos a Consumir

Sara Lúcia Soares Góis Pereira Gonçalves

Outubro 2012

Mestrado em Segurança e Qualidade Alimentar em Restauração
3ª Edição

Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril



Avaliação da Qualidade Microbiológica de Produtos Prontos a Consumir

Sara Lúcia Soares Góis Pereira Gonçalves

Dissertação apresentada à Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril para obtenção do grau de Mestre em Segurança e Qualidade Alimentar em Restauração

Orientador: Doutor Carlos Brandão

Outubro 2012

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador de Mestrado Professor Doutor Carlos Brandão pelos conselhos e revisão deste trabalho; à Cátia Morgado pela paciência e ensinamentos; à Professora Marta Castel-Branco pela revisão estatística; aos proprietários do restaurante por me permitirem a colheita das amostras; à ESHTe, que me disponibilizou a realização das análises laboratoriais.

Quero também agradecer à minha família por todo o apoio.

Índice Geral

Lista de Abreviaturas.....	v
Resumo	vi
Abstract.....	vii
Introdução Geral	1
1.1. Objectivos do Trabalho.....	4
1.2. Epidemiologia.....	5
1.3. Controlo de Qualidade Microbiológica	8
Materiais e Métodos	12
2.1. Amostragem.....	13
2.1.1. Colheita e Envio	13
2.2. Controlo Microbiológico	13
2.2.1. Preparação da Amostra.....	13
2.2.1. Pesquisa e contagem de Mesófilos	14
2.2.2. Pesquisa e contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.2.3. Pesquisa e contagem de <i>Bacillus cereus</i>	14
2.2.4. Pesquisa e contagem de Coliformes Totais	14
2.2.5. Pesquisa e contagem de <i>Escherichia coli</i>	14
2.2.6. Pesquisa e contagem de <i>Aeromonas hydrophila</i>	15
2.2.7. Pesquisa e contagem de <i>Pseudomonas</i> spp.	15
2.3. Método de Análise.....	15
2.4. Método de Classificação	15
Resultados.....	17
3.1. Estatística Descritiva	18
3.2. Classificação das amostras em função do parâmetro microbiológico	22
3.3. Avaliação da Qualidade Microbiológica dos Produtos	25
Discussão	27
Conclusão	34
Bibliografia.....	37

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Surto de toxinfecção alimentar relacionados com vegetais e frutas frescos na Europa e na América do Norte, 1994-2012	6
Tabela 2 - Valores Guia.....	16
Tabela 3 - Estatística Descritiva dos Resultados	19
Tabela 4 - Caracterização e Avaliação Microbiológica dos Produtos Prontos a Consumir	23
Tabela 5 – Ordenação das amostras em função do número de parâmetros microbiológicos não satisfatórios	25

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição das Amostras de Sandes, Salada e Fruta para cada Parâmetro	20
---	----

Lista de Abreviaturas

AIQ	Amplitude Interquartil
<i>A. hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CSPI	Center for Science in the Public Interest
CV	Coeficiente de Variação
Cfu/g	Colony-forming units
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	United States Food and Drug Administration
HPA	Health Protection Agency
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>P. spp.</i>	<i>Pseudomonas</i> species
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ufc/g	Unidades formadoras de colónias por grama

Resumo

Nos últimos vinte e cinco anos tem-se assistido a um aumento na procura de serviços que disponibilizam refeições prontas a consumir. Contudo, esta tendência trouxe problemas a nível da segurança e qualidade dos alimentos. Assim, tem-se vindo a verificar um grande número de surtos de intoxicação alimentar documentados, a nível mundial, relacionados não só com o aumento de consumo de produtos minimamente processados, como também com o incremento do comércio e distribuição internacional, e o aumento do número de consumidores de grupos vulneráveis, como imunodeprimidos.

Neste trabalho realizou-se um estudo microbiológico de produtos destinados a serem consumidos no dia de produção. Os três produtos escolhidos foram os seguintes: sandes de pasta de atum, salada de alface e tomate e fruta laminada. De cada produto foram recolhidas 15 amostras. Na realização das análises microbiológicas foram utilizadas metodologias clássicas e realizados sete parâmetros analíticos.

No total das amostras analisadas obtiveram-se, como resultados não satisfatórios 97,8% das amostras para *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*), 54,8% para coliformes totais, 29,8% para *Escherichia coli* (*E. coli*), 60,0% para mesófilos e 55,6% para *Pseudomonas species* (*P. spp.*). Os valores médios de contagens destes microrganismos foram, respectivamente, $2,5 \times 10^5$ unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g), $3,6 \times 10^5$ ufc/g, $1,4 \times 10^8$ ufc/g, $9,0 \times 10$ ufc/g e $4,9 \times 10^7$ ufc/g.

Para *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Bacillus cereus* os resultados foram satisfatórios em 95,6% e 97,8% da amostra com contaminações médias de $1,1 \times 10$ ufc/g e $1,4 \times 10$ ufc/g, respectivamente.

Numa avaliação geral dos resultados dos três alimentos analisados, todas as amostras foram consideradas não satisfatórias, uma vez que todas elas apresentavam pelo menos um parâmetro não satisfatório. Apesar desta avaliação dos alimentos, o perigo de intoxicação alimentar para o consumidor saudável é baixo.

Palavras-chave: controlo microbiológico, sandes, saladas, fruta laminada.

Abstract

For the past twenty-five years consumers have changed their eating habits resulting in an increase of services that provide ready to eat products. However, this demand may result in severe infringements in safety and quality. Thus the great numbers of documented foodborne outbreaks all over the world are due to the increase consumption of minimally processed products, as well as the increase in international trade and distribution, and the increase in the number of immune-compromised consumers.

This study focused on a microbiological assessment of products with very low shelf life. The chosen products were: tuna filled baguettes; lettuce and tomato salad; assorted sliced fruit (from this point onwards referred as baguette, salad and fruit). From each one of these categories fifteen samples were taken. All samples were analyzed using standard plating techniques looking for seven specific microorganisms.

Unsatisfactory results were found in 97.8% of samples of *A. hydrophila*, 54.8% of total coliforms, 29.8% of *E. coli* 60.0% of mesophiles and 55.6% of *P. spp.* The mean count values for these microorganisms were 2.5×10^5 colony-forming units per gram (cfu/g), 3.6×10^5 cfu/g, 1.4×10^8 cfu/g, 9.0×10 cfu/g and 4.9×10^7 cfu/g, respectively.

The results obtained from the study of *S. aureus* and *B. cereus* were satisfactory in 95.6% of the sample for the former and 97.8% for the latter. The mean contamination for these samples was of 1.1×10 cfu/g and 1.4×10 cfu/g, correspondingly.

In general the results showed that all the samples are unsatisfactory, since each and every one of them contained at least one microorganism at levels considered to be unsatisfactory. However the probabilities of food poisoning for the general population are low.

Keywords: microbiological control, sandwiches, salads, sliced fruit.

Introdução Geral

Nos Países Ocidentais, o estilo de vida é cada vez mais intenso, e apesar de se trabalhar menos horas, despende-se muito tempo em deslocações e outro tipo de actividades ditas “obrigatórias” não deixando margem para a cada vez mais nítida aspiração à autogestão do tempo de cada um, isto é à passagem do tempo “suportado” ao tempo “escolhido” (Samuel, 1984). Como consequência, verifica-se que cozinhar deixou de ser uma prioridade (Costa, Schoolmeester, Deker & Jogen, 2007). Como resposta a estas modificações verificou-se o aumento de produtos e serviços que respondam às necessidades dos consumidores, facilitando o acesso a refeições pré-preparadas. Assim o crescimento de refeições prontas a consumir tem vindo a evoluir de uma forma rápida (Geeroms, Verbeke, & Kenhove, 2008).

Os consumidores começaram a exigir produtos mais seguros e saudáveis, reduzindo os aditivos e gorduras saturadas (Codron, Grunert, Giraud-Heraud, Soler & Regmi, 2005). Verificou-se, assim, um aumento no consumo de vegetais e frutas frescas com o mínimo de processamento (Abadias, Alegre, Oliveira, Altisent & Viñas, 2008).

Os Estados Unidos da América, o Canadá, a Nova Zelândia e alguns países europeus, promoveram, as campanhas de recomendação de consumo diário de, pelo menos cinco porções de frutas e vegetais, reforçando a introdução destes alimentos nas refeições (Abadias *et al.*, 2008).

No Regulamento n.º 2073/2005 da Comissão das Comunidades Europeias, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, os alimentos prontos para consumo são “alimentos destinados pelo produtor ou fabricante ao consumo humano directo, sem necessidade de cozedura ou outra transformação, eficaz para eliminar ou reduzir para um nível aceitável os microrganismos perigosos”.

As refeições prontas a consumir definem-se como produtos consumidos no mesmo estado em que são vendidos, incluem frutas e vegetais crus, em que consumidor não tem que retirar o pedúnculo ou folhas, descascar e/ou lavar, e não incluem nozes com casca ou inteiras (Australia New Zealand Food Authority [ANZFA], 2001).

Estes produtos podem igualmente não sofrer qualquer processamento térmico, e podem ser considerados potencialmente perigosos para a saúde, uma vez que, uma eventual contaminação não será minimizada ou eliminada antes do seu consumo (ANZFA, 2001). Desta forma, é de extrema importância um armazenamento seguro,

tendo em conta a relação tempo/temperatura, e a sua manipulação (Scientific Committee on Food [SCF], 2002).

Os microrganismos fazem parte da flora dos frutos e vegetais, na sua maioria são Gram-negativos e pertencem ao grupo das *Pseudomonas* ou das *Enterobacteriaceae*. O número de bactérias presente pode apresentar valores médios de variação entre desde 10^4 a 10^8 ufc/g, de acordo com as mudanças climáticas e as estações do ano. Os tecidos interiores dos frutos e vegetais são, regra geral, considerados estéreis, contudo, há a possibilidade de estarem presentes, em baixo número, bactérias, devido à contaminação das águas de irrigação e lavagem (Lund, Glass, Cohen, Bern & Moe, 1986; SCF, 2002).

A sobrevivência e crescimento de agentes patogénicos dependem de factores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos. Nos primeiros encontramos composição nutricional, pH, textura, valor da actividade da água (a_w) e potencial redox do alimento. Nos segundos encontramos a temperatura e a atmosfera circundante. Outro factor que contribui para a contaminação e crescimento de bactérias nos vegetais e frutas são os processos utilizados desde a sua germinação até chegar ao local de preparação (SCF, 2002).

Durante o crescimento, a contaminação ocorre através de solos e da água. Na apanha, a contaminação ocorre através das máquinas agrícolas, com o corte dos vegetais e consequente aumento da superfície de contacto criando-se as condições propícias para o crescimento microbiano e a infiltração dos microrganismos nos tecidos (SCF, 2002). O período de armazenamento e de distribuição, a contaminação pode resultar da acção de pragas de roedores, insectos e aves. Na altura do processamento e da preparação ocorre através dos manipuladores ou de contaminação cruzada (World Health Organisation [WHO], 2006).

Nos diferentes processos de corte aos quais os alimentos estão expostos desde a fase de produção primária até ao consumidor final, a remoção da protecção da planta ou fruto através do corte, põe em causa a segurança do produto. Os agentes patogénicos existentes, tanto na superfície dos alimentos como nos equipamentos e utensílios de corte, irão contaminar as zonas expostas dos alimentos (SCF, 2002). Os diferentes cortes dos vegetais provocam um aumento de seis a sete vezes no número de microrganismos iniciais (Garg, Churey & Splittstoesser, 1990; Francis, Thomas & O'Beirne, 1999).

As sandes podem ser definidas como qualquer tipo de pão, com recheio, geralmente frio, e incluem sandes de pão de forma ou bola, baquetes, pão pita, *wraps*, *bagel*, e outro pão do género. Não inclui hambúrgueres e outros que sejam produzidos e consumidos quentes (The British Sandwich Association, 2007). Os recheios deste tipo de produtos variam largamente, podendo conter produtos de conserva, maionese, ovos e vegetais frescos.

A maionese é um produto muitas vezes usado como molho nas sandes, e tem estado na origem de muitos surtos de *Salmonella*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, entre outros. Desde, o surto, na Dinamarca, que provocou 10 mil casos, em 1955, foi determinado que o pH da maionese deveria ser inferior a 4,5, uma vez que estes microrganismos patogénicos não se desenvolvem em meio ácido. Assim, os surtos existentes estão associados principalmente com o uso de maionese caseira, feita com ovos frescos contaminados, misturada com outros ingredientes e mantida a temperaturas elevadas, ou incorrectamente manipulado no local de venda (Lund, Baird-Parker & Gould, 2000; Fraser, 2008; Smittle, 2000).

Os alimentos são, assim, fonte de contaminação por agentes patogénicos para os seres humanos. A probabilidade de ocorrência de uma intoxicação alimentar depende da quantidade de bactérias presentes, da dose mínima infecciosa e da susceptibilidade do indivíduo, que ingere o alimento. Os indivíduos do denominado grupo YOPI (young, old, pregnant and immunosuppressed – jovens, idosos, grávidas e imunodeprimidos) apresentam um risco elevado de contrair uma toxinfecção alimentar, de maior severidade (SCF, 2002).

1.1. Objectivos do Trabalho

Tendo em conta os surtos verificados a nível mundial, as suas consequências na saúde dos indivíduos e a sua importância epidemiológica crescente, procurou-se determinar, neste trabalho, a qualidade microbiológica numa unidade de restauração com venda directa ao público de refeições prontas a consumir à base de pasta de atum, vegetais e fruta fresca laminada.

A realização do objectivo principal dependeu da realização dum conjunto de trabalhos específicos:

- Levantamento de bibliografia na importância epidemiológica de refeições prontas a comer;

- Avaliação de factores de risco em produtos à base de pasta de atum, vegetais e frutas frescas;
- Avaliação da qualidade microbiológica geral (tipo de agentes bacterianos contaminantes e em que quantidade estão presentes);
- Determinação da taxa de conformidade microbiológica com base em critérios microbiológicos;
- Elaboração de recomendações para preparação e comercialização para este tipo de produtos.

1.2. Epidemiologia

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento na incidência de surtos de origem alimentar (Mukherjee, Speh, Jones, Buesing & Diez-Gonzalez, 2006). Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que, aproximadamente, 48 milhões de pessoas adoecem, destas 128 mil são hospitalizadas e 3 mil morrem de toxinfecções alimentares, todos os anos. Os agentes patogénicos, mais comuns, que causam estas doenças são Norovírus, *Salmonella* não tifóide, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter spp.* e *S. aureus*. (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2011a).

Os microrganismos frequentemente associados a surtos, com origem em vegetais e fruta fresca, são bactérias, como *Salmonella spp.* e *E. coli*, vírus, como vírus de Norwalk e da hepatite A, e parasitas, como *Cryptosporidium* e *Cyclospora* (Tauxe *et al.*, 1997).

Vários surtos têm ocorrido recentemente na América do Norte, envolvendo legumes frescos, como tomates e pimentos. Em 2008 ocorreram 1442 casos, dos quais, pelo menos, 286 foram hospitalizados, tendo ocorrido dois óbitos. O agente patogénico envolvido nestes dois casos mortais foi a *Salmonella saintpaul* (Center for Science in the Public Interest [CSPI], 2012).

A Tabela 1 descreve alguns surtos de toxinfecção de origem alimentar relacionados com vegetais e frutas frescas na Europa e na América do Norte entre 1994 e 2012.

Tabela 1 - Surtos de toxinfecção alimentar relacionados com vegetais e frutas frescos na Europa e na América do Norte, 1994-2012

Ano	Produtos envolvidos	Agente Patogénico	País de Origem do Produto	País do Surto	Número de Casos	Referência
2012	Melancia	<i>Salmonella newport</i>	-	RU	30	(Health Protection Agency [HPA], 2012)
2011	Papaia	<i>Salmonella agona</i>	México	EUA	106	CSPI, 2012)
2011	Meloas	<i>Salmonella panama</i>	Guatemala	EUA	21	CSPI, 2012)
2010	Alface Lollo Bionda	<i>E. coli</i> enterotoxigénica e Norovírus	França	Dinamarca	260	(Ethelberg <i>et al.</i> , 2012)
2010	Aipo	<i>Listeria monocitogenes</i> (<i>L. monogitogenes</i>)	-	EUA	10	(CSPI, 2012)
2008	Tomate e pimentos	<i>Salmonella saintpaul</i>	-	EUA e Canadá	1442	(CSPI, 2012)
2007	Alface cortada e embalada	<i>E. coli</i> enterotoxigénica	Holanda	Holanda e Islândia	50	(Friesema <i>et al.</i> , 2008)
2006	Espinafre	<i>E. coli</i> O157:H7	-	EUA	200	(U.S. Food and Drug Administration [FDA], 2007)
2005	Alface	<i>E. coli</i> O157:H7	Suécia	Noruega e Suécia	120+	(Söderstrom, Lindberg & Andersson, 2005)
2005	Alface	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Espanha	RU	96	(HPA, 2005)
2005	Alface	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Espanha	Finlândia e Suécia	60+	(Takkinen <i>et al.</i> , 2005)
2004	Alface	<i>Salmonella newport</i>	Espanha	RU	375	(HPA, 2004)
2003	Alface	<i>Salmonella braenderup</i>	Espanha	RU	40	(HPA, 2003)
2000	Alface iceberg	<i>Salmonella newport</i>	Espanha	RU	19	(Ward <i>et al.</i> , 2002)
2000	Alface	<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	RU	361	(Horby <i>et al.</i> , 2003)
2000	Alface	<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	Dinamarca e Alemanha	140	(Crook <i>et al.</i> , 2003)
1994	Alface iceberg	<i>Shigella sonnei</i>	Espanha	Noruega, RU e Suécia	218	(Frost, McEvoy, Bentley, Andersson & Rowe, 1995)

A globalização do comércio de vegetais e fruta, dentro da União Europeia representa 17 milhões de toneladas por ano (SCF, 2002). Estes movimentos de mercadorias podem favorecer a ocorrência de doenças provocadas por microrganismos contaminantes deste tipo de alimentos (Little & Gillespie, 2008).

Em Inglaterra e País de Gales registaram-se 61 surtos de toxinfecções alimentares, em 2010. Destes, resultaram 1396 pessoas doentes, 82 hospitalizações e cinco mortes. Neste ano verificou-se um decréscimo no número de surtos provocados por *Salmonella* spp., assim o *Campylobacter* spp. foi o agente patogénico comumente isolado, seguido pelo Norovírus, outros vírus, e *Salmonella* spp.. Dos 61 surtos, quatro tiveram origem em vegetais e frutos, um teve como agente patogénico o Norovírus, e três a *Salmonella* spp. (HPA, 2011).

Na Europa, em países como Holanda, Inglaterra, Noruega, Suécia, Finlândia, Dinamarca e Alemanha, a alface tem sido o alimento mais implicado como veículo de infecção, nomeadamente por várias estirpes de *Salmonella*, *E. coli* e *Shigella*. Na maioria dos surtos o provável país de origem da alface foi Espanha (Ethelberg *et al.*, 2012; Friesema *et al.*, 2008; Söderstrom *et al.*, 2005; HPA, 2003, 2004, 2005; Takkinen *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2002; Horby *et al.*, 2003; Crook *et al.*, 2003; Frost *et al.*, 1995).

Nas sandes os principais microrganismos isolados são bactérias, como, *C. botulinum*, *Salmonella*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, e todos os patogénicos associados a vegetais frescos (Foote, Jess & Remley, 2009) (Lund *et al.*, 2000). Descrevem-se de seguida alguns surtos relacionados com o consumo de sandes, na Europa e nos EUA.

Num hospital Swansea, no País de Gales, em Dezembro de 2000, ocorreu um surto associado ao consumo de sandes de maionese e ovos, cujo agente patogénico foi a *Salmonella indiana*, devido provavelmente a deficiente pasteurização dos ovos (Mason *et al.*, 2001).

Em 2002, verificou-se um surto num hospital em Cardiff, que envolveu dois casos de contaminação por *L. monocytogenes*, em dois doentes internados. A fonte de contaminação das sandes, de pasta de fiambre e pasta de atum, foi o pavimento da fábrica que produzia estes produtos, que era limpo com os mesmos utensílios com que se limpava a bancada. Este facto associado à temperatura a que as sandes eram

conservadas, contribuiu para o crescimento bacteriano (Shetty, McLauchlin, O'Brien, Howard & Davies, 2009).

Em Março de 2009 ocorreu um surto num hotel em Dublin, na Irlanda, que causou 27 casos por consumo de sandes de pasta de maionese e ovos, peru recheado e galinha. A contaminação dos produtos por norovírus atribui-se aos manipuladores infectados (Nicolay *et al.*, 2011).

Um surto de *E. coli enterotoxigénica*, ocorreu em seis estados dos EUA, em Fevereiro de 2012, envolvendo 14 casos, com duas hospitalizações. O surto foi associado ao consumo de sandes com rebentos de alho, num restaurante de venda de sandes (CDC, 2012).

1.3. Controlo de Qualidade Microbiológica

No presente trabalho o controlo da qualidade microbiológica dos três produtos prontos a consumir escolhidos foi realizada através de testes à presença de sete microrganismos: mesófilos, *S. aureus*, *Bacillus cereus* (*B. cereus*), coliformes totais, *E. coli*, *A. hydrophila* e *P. spp.*.

Os mesófilos são todos os microrganismos que crescem a temperaturas entre os 15 e os 40°C, aproximadamente, podem ser encontrados no solo e na água e têm capacidade de utilização dos nutrientes presentes numa variedade de substratos, quer de natureza vegetal, quer animal. Estes microrganismos podem também ser encontrados no ar dos ambientes de processamento, podendo contaminar os alimentos. Estes locais terão uma maior ou menor contaminação de acordo com o número de trabalhadores, sistema de ventilação e circulação do ar, sistema de escoamento, águas de lavagem e desinfecção dos locais, e acessos ao exterior (Al-Dagal, Mo, Fung & Kastner, 1992; Salustiano, Andrade, Brandão, Azevedo & Lima, 2003).

No intervalo de temperatura ótimo, dos 30 a 37°C, os mesófilos têm um tempo de geração curto, aproximadamente vinte minutos. Desta forma, os mesófilos são indicadores do número total de microrganismos presentes nos alimentos. A maioria das toxinfecções alimentares é provocada pelo grupo dos mesófilos, como *S. aureus*, *E. coli* e *B. cereus* (Lerner & Lerner 2003; State Laboratory of the Canton Basel City, 2002).

S. aureus é uma bactéria Gram positiva, pertencente à família dos *Micrococcaceae*. O seu nome tem origem na sua forma de cocos, agrupados em cacho e

são imóveis. Podem produzir enterotoxinas, que causam as intoxicações alimentares (Cristino, 2000; Bergoll & Wong, 2006). Estes microrganismos estão presentes na pele e mucosas dos animais com capacidade termorreguladora. Entre 20 a 40% da população humana saudável é portadora desta bactéria na nasofaringe (Cristino, 2000).

Os manipuladores de produtos alimentares, assim como, equipamentos e superfícies de produção, são fontes de contaminação de *S. aureus*. Os alimentos associados a toxinfecções por esta bactéria são produtos muito manipulados, com recheios sobretudo contendo ovos, devido ao alto valor nutritivo, que favorece o crescimento microbiológico. Também os produtos que não tenham atingido temperaturas acima dos 60°C durante a confecção ou não sejam armazenados a temperaturas abaixo dos 7,2°C estão associados a estas toxinfecções. Sintomas como vômitos intensos, náuseas, diarreia e dor abdominal ocorrem na toxinfecção alimentar por *S. aureus*. Estes sintomas tornam-se mais graves no grupo YOPI (FDA, 2005; Cristino, 2000; Bergoll & Wong, 2006).

Este agente patogénico é um indicador de manipulação incorrecta dos alimentos e de armazenamento a temperaturas acima de 7,2°C (New South Wales Food Authority, 2009). No entanto, o *S. aureus* pode ver o seu crescimento inibido por se tornar incapaz de competir pelos nutrientes com a microflora saprófita como *Aeromonas*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, e por modificação das condições ambientais para umas menos favoráveis ao seu crescimento. (Jay, 2000)

B. cereus é uma bactéria Gram positiva, que pertence à família *Bacillaceae*, e é um agente esporulado. O seu nome deve-se à sua forma de bacilo, ou seja, bastonetes, grandes em dimensão, e móveis. Estes microrganismos podem provocar dois tipos distintos de doença, a emética e a diarreica, através da produção de duas enterotoxinas diferentes (Lopes, 2000).

Este microrganismo encontra-se distribuído pela natureza, podendo ser isolado do solo, pó, colheitas de cereais, vegetação, pelos de animais, água e matéria orgânica em decomposição. Os alimentos susceptíveis de contaminação são de origem animal e vegetal, sendo os últimos, no entanto, os mais perigosos, nomeadamente cereais como o arroz. A doença diarreica, especificamente, é associada a alimentos, como a carne, leite, vegetais e peixe. A doença emética, por seu lado, está associada ao arroz, e batatas, massas, queijos, e também a preparados, como molhos, sopas e saladas (Lopes, 2000; FDA, 2009).

Os sintomas da toxinfecção por *B. cereus* do tipo diarreico são diarreia aquosa acompanhada de cólicas. O tipo emético apresenta como sintomas vômitos e náuseas, sintomas semelhantes aos provocados pelo *S. aureus*. (Lopes, 2000). Este agente é indicador de contaminação ambiental (FDA, 2009; Lopes, 2000).

Os coliformes pertencem à família das *Enterobacteriaceae* e são bacilos Gram negativos. Teoricamente, estas bactérias deveriam ser de origem intestinal, contudo muitas delas apresentam conotação fecal baixa, tendo uma distribuição ubiquitária, e encontrando-se em solos, plantas e água (de Sousa, 2000).

As principais fontes de contaminação por *E. coli* são fezes de animais e humanos, que se encontram nas águas e solos de campos agrícolas. Igualmente, pode haver contaminação do leite e da carne durante processos de ordenha, abate e evisceração. Assim, como veículos de contaminação consideram-se produtos hortícolas consumidos frescos, leite cru, queijo curado, carne e enchidos curados (Fratamico & Smith, 2006). Este microrganismo é um indicador de contaminação fecal (de Sousa, 2000).

Existem diferentes patotipos de *E. coli*, salienta-se, no entanto a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que coloniza o tracto intestinal e produz verotoxinas, que podem provocar além de uma colite hemorrágica um síndrome hemolítico-urémico sobretudo em crianças até aos cinco anos de idade, e mais raramente púrpura trombótica trombocitopénica nos idosos (de Sousa, 2000; Fratamico & Smith, 2006).

As *A. hydrophila* são bacilos Gram negativos. Este microrganismo é patogénico sobretudo para animais aquáticos, como os peixes e anfíbios, mas também para o ser humano, através de ingestão e de soluções de continuidade como feridas cutâneas. Este agente pode ser encontrado na água salgada, e também nas águas residuais (Jay, 2000) (Hajmeer & Fung, 2006). Os veículos de contaminação alimentar podem ser peixe, marisco, carne, e também vegetais (FDA, 2009; McMahon & Wilson, 2001).

As *A. hydrophila* foram associadas a dois tipos de toxinfecção, uma com características semelhantes à cólera, que provoca diarreia aquosa, e outra que provoca disenteria. Nos doentes imunocomprometidos, o agente pode causar uma infecção generalizada. No grupo infantil é frequente causarem uma doença gastrointestinal. Este agente é indicador de contaminação ambiental (FDA, 2009).

As *P. spp.* pertencem à família das *Pseudomonadaceae*, e são bastonetes Gram negativos, que constituem o maior género de bactérias existentes em alimentos frescos, pois a maioria das espécies e estirpes são psicrotróficas, desenvolvendo-se entre os 0 e 15°C (Moyer & Morita, 2007; Jay, 2000).

As fontes de contaminação dos alimentos são o solo e a água. Os produtos alimentares susceptíveis de contaminação são vegetais, carne, aves e marisco (Jay, 2000). Estes microrganismos raramente causam doença em indivíduos saudáveis, contudo podem infectar doentes imunodeprimidos, especialmente em contexto de infecção nosocomial (Ducel *et al.*, 2002). Este agente é indicador de má lavagem, desinfecção e degradação dos alimentos (Littlewood, 2007).

Materiais e Métodos

2.1. Amostragem

2.1.1. Colheita e Envio

A recolha das amostras foi realizada num restaurante localizado em Lisboa de venda de refeições destinadas a ser consumidas no dia. Os três produtos escolhidos foram os seguintes:

- Sandes de pasta de atum, com ovo cozido, milho cozido, e produtos crus, como alface, tomate e cenoura;
- Salada de alface e tomate;
- Fruta laminada, como carambola, pitaia, manga, papaia, kiwi, melão, uvas, ananás e laranja.

As sandes encontravam-se preparadas e prontas a consumir, acondicionadas num saco de papel não selado, e armazenadas numa bancada refrigerada. A preparação das sandes era realizada sobre uma bancada exclusivamente destinada a esse efeito. A salada e a fruta laminada encontravam-se em cubas num expositor refrigerado.

As amostras foram recolhidas entre 23 de Maio e 22 de Junho de 2011, entre as 12h e 13h. Em cada dia foram recolhidas em sacos de amostra (Whirl-Pak®) uma amostra de cada um dos produtos em estudo, no total de 45, 15 de cada produto. A recolha das amostras foi aleatória tendo sido removida uma fracção da salada e fruta laminada contida na respectiva cuba. As sandes foram requisitadas directamente aos funcionários.

As amostras foram recolhidas de forma asséptica em contentor isotérmico e analisadas no dia da colheita, no Laboratório de Microbiologia Alimentar da Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril.

2.2. Controlo Microbiológico

2.2.1. Preparação da Amostra

Os produtos foram analisados recorrendo a técnicas e metodologias clássicas de microbiologia alimentar. De cada amostra foram retiradas e medidas 10g numa balança centesimal (Kern® FOK 11K1M), que foram suspensos em 90 ml de água peptonada num saco de homogeneizador (Stomacher® Bags BA6041, Steward), homogeneizados no equipamento Stomacher® 400 circulator (Seward) sendo obtida a solução mãe. De seguida foram efectuadas diluições decimais. Por cada amostra foram analisados os

seguintes parâmetros: *A. hydrophila*, *B. cereus*, coliformes totais, *E. coli*, mesófilos, *P. spp.* e *S. aureus*.

2.2.1. Pesquisa e contagem de Mesófilos

O meio de cultura utilizado na pesquisa de mesófilos foi o meio Plate Count Agar (PCA) (Biokar, BK144HA). A sementeira foi realizada a 30°C durante 72 horas. As colônias apresentam cor branca leitosa a amarela (Biokar Diagnostics, 2010).

2.2.2. Pesquisa e contagem de *Staphylococcus aureus*

O meio de cultura utilizado na pesquisa de *S. aureus* foi o Baird Parker RPF Agar (Biokar, BS03408). O período de incubação das sementeiras é 48 horas a 37°C. As colônias apresentam cor cinza antracite ou preta, resultante da redução da telurite a telúrio, com produção de halos opacos em volta das colônias (Biokar Diagnostics, 2010).

2.2.3. Pesquisa e contagem de *Bacillus cereus*

O meio de cultura utilizado na pesquisa de *B. cereus* foi o meio Mossel (Biokar, BK116HA). A incubação foi realizada a 30°C durante 48 horas. As colônias de morfologia típica de *B. cereus* apresentam-se cor-de-rosa, manitol negativas e com contorno regular, achatadas e com halo opaco à volta, indicação de produção de lecitinase (Biokar Diagnostics, 2010).

2.2.4. Pesquisa e contagem de Coliformes Totais

O meio de cultura utilizado para identificação de coliformes totais foi o Violet Red Bile Agar (Biokar, BK152HA). O período de incubação das sementeiras foi 24 horas a 37°C. As colônias de morfologia típica são de cor carmim, com diâmetro de 0,5 mm ou mais (Biokar Diagnostics, 2010).

2.2.5. Pesquisa e contagem de *Escherichia coli*

A identificação de *E. coli* foi feita através do meio Tryptone Bile X-Glucuronide Agar (Biokar, BK146HA). As placas foram incubadas a 44°C durante 24 horas. As colônias de morfologia típica de *E. coli* identificam-se pela sua cor azul, devido à acção da β -D-glucuronidase. (Biokar Diagnostics, 2010).

2.2.6. Pesquisa e contagem de *Aeromonas hydrophila*

A pesquisa de *A. hydrophila* foi feita através do meio Ryan (Oxoid, SR0136E) (Oxoid Limited, 2010). A incubação foi realizada a 30°C durante 24 horas. As colónias de morfologia típica são verdes escuras e opacas, com centros escurecidos. O meio de cultura para isolamento e identificação de *A. hydrophila* é baseado na formulação de Ryan, é uma modificação do meio Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD Agar), que é utilizado para a detecção de Salmonela. Este meio torna-se mais selectivo pela adição de ampilina (Fluka Analytical, 2007/2008).

2.2.7. Pesquisa e contagem de *Pseudomonas* spp.

O meio de cultura utilizado na pesquisa de *P. spp.* foi o Pseudomonas Agar Base (Oxoid, SR0103E) (Oxoid Limited, 2010). O período de incubação das sementeiras é 24 horas a 30°C. As colónias apresentam cor amarela clara com pigmentação verde. O meio usa sais de magnésio e potássio para promover a formação de piocianina, que facilita a visualização das colónias (Lab M Limited, 2006).

2.3. Método de Análise

Realizou-se a análise quantitativa, descritiva e comparativa dos resultados utilizando-se o *software* Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 17.0.0 de 2008, Agosto, 23.

2.4. Método de Classificação

Após a leitura e interpretação dos resultados as amostras foram parametrizadas em satisfatório, aceitável e não satisfatório, segundo os valores guia utilizados na avaliação da qualidade microbiológica, apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores Guia

Microrganismo	Alimento	Qualidade Microbiológica (ufc/g)			
		Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório	Inaceitável/ potencialmente perigoso
Mesófilos (Santos, M., Correia, C., Cunha, M., Saraiva, M., Novais, M., 2005)	Sandes Saladas e Frutas	$\leq 10^2$ $\leq 10^4$	$>10^2 \leq 10^4$ $>10^4 \leq 10^6$	$>10^4$ $>10^6$	- -
<i>S. aureus</i> (Santos <i>et al.</i> , 2005)	Todos	$<10^2$	-	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$
<i>B. cereus</i> (Santos <i>et al.</i> , 2005)	Todos	$\leq 10^2$	$>10^2 \geq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^5$
Coliformes Totais (Santos <i>et al.</i> , 2005)	Sandes Saladas e Frutas	≤ 10 $\leq 10^2$	$>10 \geq 10^2$ $>10^2 \geq 10^4$	$>10^2$ $>10^4$	- -
<i>E. coli</i> (Santos <i>et al.</i> , 2005)	Sandes Saladas e Frutas	<10 ≤ 10	- $>10 < 10^2$	≥ 10 $\geq 10^2$	- -
<i>A. hydrophila</i> (Mattick & Donovan, 1998)	Todos	$<10^2$	-	$\geq 10^2$	-
<i>P. spp</i> (Guerzoni, Gianotti, Corbo, & Sinigaglia, 1996; García-Gimeno & Zurera-Cosano, 1997; HPA, 2009)	Todos	$\leq 10^6$	-	$>10^6$	- -

Resultados

3.1. Estatística Descritiva

Depois de constituída a amostra foi realizada uma análise descritiva da mesma, com recurso a medidas de tendência central (média amostral e mediana amostral), medidas de dispersão (desvio padrão, amplitude inter-quartil (AIQ) e coeficiente de variação (CV)) e análise gráfica. Os resultados constam na Tabela 1 e nos Gráficos.

A média é a medida de localização mais frequentemente usada e é obtida dividindo a soma de todos os valores numéricos observados pelo número de observações. A mediana divide ao meio o conjunto de valores observados e define-se como o valor que, depois das observações ordenadas por ordem crescente, divide a amostra de forma que 50% das observações sejam superiores ou iguais à mediana e 50% sejam inferiores ou iguais à mediana. Ambas são medidas de localização central e representam um valor à volta do qual se distribuem os dados.

O desvio padrão é uma medida de variabilidade e mede a dispersão dos valores em torno da média. Quanto maior o valor do desvio padrão, maior a variabilidade dos dados.

A AIQ reflete a variabilidade de metade das observações centrais e corresponde à diferença entre o 3º quartil (i.e. o valor superior ou igual a 75% das observações, ordenadas por ordem crescente) e o 1º quartil (i.e. o valor superior ou igual a 25% das observações, ordenadas por ordem crescente). Esta medida será tanto maior quanto maior a variabilidade dos dados.

O CV é uma medida de dispersão relativa ao valor da média (corresponde ao desvio padrão a dividir pela média amostral) e é expresso em percentagem. Permite comparar a variabilidade de grupos diferentes (com médias diferentes) relativamente à mesma variável. Quanto menor o valor do coeficiente de variação mais homogéneos são os dados.

Tabela 3 - Estatística Descritiva dos Resultados

Microrganismos	Produto	Média (ufc/g)	Mediana (ufc/g)	Desvio Padrão (ufc/g)	AIQ¹ (ufc/g)	CV² (%)
Mesófilos	Total	1,4x10 ⁸	2,4x10 ⁶	5,2x10 ⁸	2,9x10 ⁷	371,4
	Sandes	2,5x10 ⁷	8,2x10 ⁶	3,4x10 ⁷	2,9x10 ⁷	136
	Salada	2,2x10 ⁸	1,8x10 ⁶	7,1x10 ⁸	3,1x10 ⁵	322,7
	Fruta	1,8x 10 ⁸	1,0x10 ⁵	5,6x10 ⁸	1,1x10 ⁸	311,1
<i>S. aureus</i>	Total	1,1x10	<10	6,1x10	<10	554,5
	Sandes	<10	<10	<10	<10	0
	Salada	2,6x10	<10	1,0x10 ²	<10	384,6
	Fruta	6,7	<10	2,5x10	<10	373,1
<i>B. cereus</i>	Total	1,4x10	<10	4,0x10	<10	285,7
	Sandes	2,0x10	<10	5,6x10	<10	280
	Salada	6,7x10 ⁻¹	<10	2,6	<10	388,1
	Fruta	2,0x10	<10	4,1x10	<10	205
Coliformes Totais	Total	3,6x10 ⁵	2,1x10 ⁴	1,2x10 ⁶	1,5x10 ⁵	333,3
	Sandes	5,3x10 ⁵	5,7x10 ⁴	1,6x10 ⁶	1,7x10 ⁵	301,9
	Salada	4,9x10 ⁵	6,0x10 ⁴	1,3x10 ⁶	2,8x10 ⁵	265,3
	Fruta	7,7x10 ⁴	6,1x10 ³	2,5x10 ⁵	1,6x10 ⁴	324,7
<i>E. coli</i>	Total	9,0x10	1,0x10	2,1x10 ²	6,0x10	233,3
	Sandes	1,8x10 ²	1,0x10 ²	2,2x10 ²	4,9x10 ²	122,2
	Salada	8,3x10	<10	2,7x10 ²	3,0x10	325,3
	Fruta	1,1x10	<10	2,9x10	1,0x10	263,6
<i>A. hydrophila</i>	Total	2,5x10 ⁵	4,9x10 ³	5,3x10 ⁵	2,0x10 ⁵	212
	Sandes	4,1x10 ⁵	6,3x10 ⁴	7,4x10 ⁵	7,1x10 ⁵	180,5
	Salada	1,6x10 ⁵	2,2x10 ⁴	3,0x10 ⁵	2,0x10 ⁵	187,5
	Fruta	1,8x10 ⁵	1,3x10 ³	4,5x10 ⁵	1,4x10 ⁵	250
<i>P. spp.</i>	Total	4,9x10 ⁷	2,1x10 ⁶	1,1x10 ⁸	2,8x10 ⁷	224,5
	Sandes	2,9x10 ⁷	4,0x10 ⁶	5,9x10 ⁷	4,8x10 ⁷	203,4
	Salada	7,0x10 ⁷	2,3x10 ⁶	1,5x10 ⁸	2,0x10 ⁷	214,3
	Fruta	4,7x10 ⁷	4,7x10 ⁴	9,1x10 ⁷	3,6x10 ⁷	193,6

¹ AIQ = Q₇₅ – Q₂₅

² CV = $\frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média}} \times 100\%$

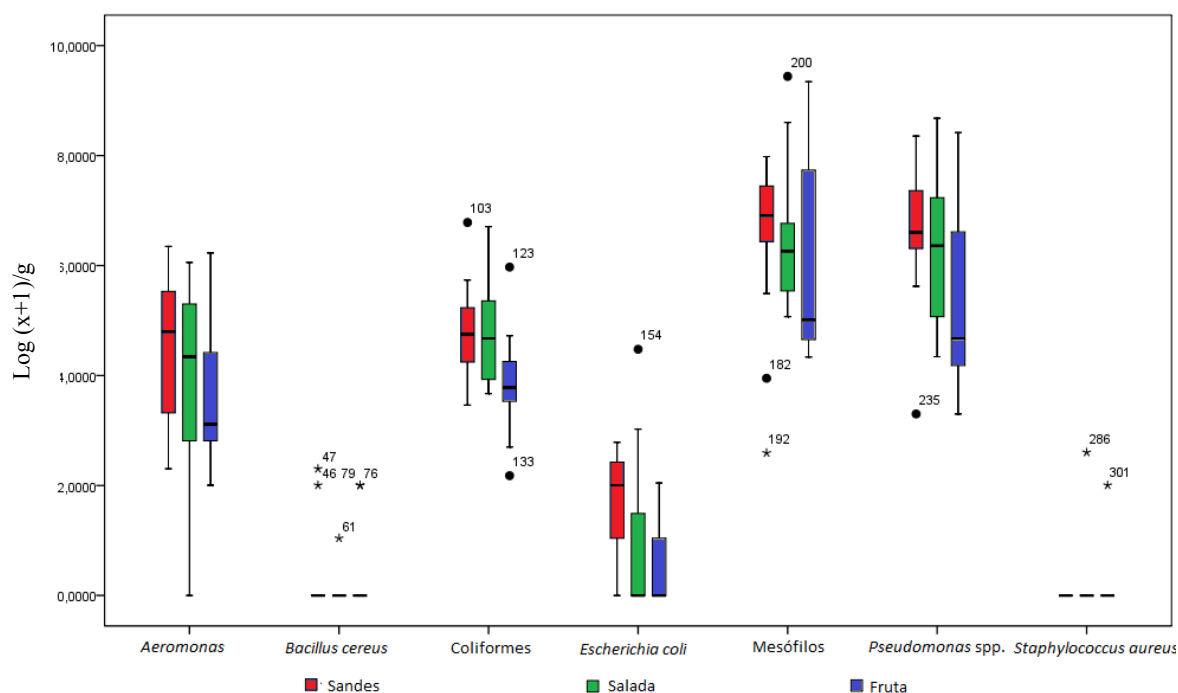


Gráfico 1 - Distribuição das Amostras de Sandes, Salada e Fruta para cada Parâmetro

Através da leitura da tabela 3 podemos observar que os valores da média e da mediana de mesófilos na amostra total e nas amostras de sandes, salada e fruta são, respectivamente, $1,4 \times 10^8$ ufc/g e $2,4 \times 10^6$ ufc/g, $2,5 \times 10^7$ ufc/g e $8,2 \times 10^6$ ufc/g, $2,2 \times 10^8$ ufc/g e $1,8 \times 10^6$ ufc/g, e $1,8 \times 10^8$ ufc/g e $1,0 \times 10^5$ ufc/g.

Os valores apresentados para cada uma das amostras dos três produtos são próximos, sendo de referir que a amostra de sandes apresenta valores de desvio padrão e de CV inferiores, refletindo uma menor dispersão dos dados em torno da média. Relativamente ao valor da AIQ observa-se que a amostra de saladas é a que apresenta o valor mais baixo e que a amostra de frutas é a que apresenta o valor mais elevado. Esta medida reflete a dispersão dos valores centrais da amostra ordenada e pode ser visualizado através do diagrama de extremos e quartis (*box plot*) onde a dimensão das caixas é maior para a amostra de frutas e menor para a de saladas.

Os valores da média e da mediana na amostra total e nas amostras de sandes, salada e fruta de *S. aureus* são respectivamente $1,1 \times 10$ ufc/g e <10 ufc/g, <10 ufc/g e <10 ufc/g, $2,6 \times 10$ ufc/g e <10 ufc/g, $6,7$ ufc/g e <10 ufc/g.

Os valores dos produtos são próximos, mostrando dispersões em torno da média semelhantes, com exceção da amostra de sandes, uma vez que não se obteve resultados positivos para a presença do microrganismo. O valor da AIQ para todas a amostras tem

valor inferior a 10 ufc/g, o que se deve ao valor do 3º quartil ser inferior a 10 ufc/g, que indica que pelo menos 75% das observações têm contagens inferiores a 10 ufc/g.

Os valores apresentados na pesquisa de *B. cereus* para a média e a mediana da amostra total e amostras dos produtos selecionados (sandesh, saladas e fruta laminada) são $1,4 \times 10$ ufc/g e <10 ufc/g, $2,0 \times 10$ ufc/g e <10 ufc/g, $6,7 \times 10^{-1}$ ufc/g e <10 ufc/g, e $2,0 \times 10$ ufc/g e <10 ufc/g, respectivamente.

Os valores dos produtos são próximos, sendo de referir que o valor do CV da amostra de saladas apresenta um valor mais elevado, que reflete uma maior dispersão dos dados em torno da média. O valor da AIQ para todas as amostras tem valor inferior a 10 ufc/g, o que se deve ao valor do 3º quartil ser inferior a 10 ufc/g, que indica que pelo menos 75% das observações têm contagens inferiores a 10 ufc/g.

A pesquisa de coliformes totais apresenta os seguintes valores para a média e a mediana da amostra total e amostras de sandesh, saladas e fruta laminada: $3,6 \times 10^5$ ufc/g e $2,1 \times 10^4$ ufc/g, $5,3 \times 10^5$ ufc/g e $5,7 \times 10^4$ ufc/g, $4,9 \times 10^5$ ufc/g e $6,0 \times 10^4$ ufc/g, e $7,7 \times 10^4$ ufc/g e $6,1 \times 10^3$ ufc/g, respectivamente.

Os valores apresentados para cada uma das amostras dos três produtos são próximos, assim como os valores do CV, que indica uma dispersão semelhante dos dados das amostras dos três produtos em torno da média. Relativamente ao valor da AIQ observa-se que a amostra de fruta laminada é a que apresenta o valor mais baixo e que a amostra de salada é a que apresenta o valor mais elevado. Esta medida reflete a dispersão dos valores centrais da amostra ordenada e pode ser visualizado através do gráfico 1 onde a dispersão é maior para a amostra de salada e menor para a de fruta.

Os valores da média e da mediana na amostra total e nas amostras de sandesh, salada e fruta de *E. coli* são, respectivamente, $9,0 \times 10$ e $1,0 \times 10$, $1,8 \times 10^2$ e $1,8 \times 10^2$, $8,3 \times 10$ e zero, e $1,1 \times 10$ e zero ufc/g.

Os valores dos três produtos são próximos, sendo de referir que a amostra de sandesh apresenta o valor de CV inferior, indicando uma menor dispersão dos valores centrais da amostra ordenada. Relativamente ao valor da AIQ observa-se que a amostra de fruta laminada é a que apresenta o valor mais baixo e que a amostra de sandesh é a que apresenta o valor mais elevado. Esta medida reflete a dispersão dos valores centrais da amostra ordenada e pode ser visualizado através do gráfico 1 onde a dispersão é maior para a amostra de sandesh e menor para a de fruta.

Os valores apresentados na pesquisa de *A. hydrophila* para a média e a mediana da amostra total e amostras dos produtos selecionados (sandesh, saladas e fruta laminada) são, respectivamente, $2,5 \times 10^5$ e $4,9 \times 10^3$, $4,1 \times 10^5$ e $6,3 \times 10^4$, $6,3 \times 10^4$ e $2,2 \times 10^4$, e $1,8 \times 10^5$ e $1,3 \times 10^3$ ufc/g.

Os valores dos produtos são próximos, de referir que o valor do CV da amostra de fruta apresenta um valor mais elevado, que reflete uma maior dispersão dos dados em torno da média. O valor da AIQ para a amostra de sandesh é superior, enquanto que o valor da amostra de fruta laminada é inferior. Esta diferença das amostras pode ser visualizada no gráfico 1, onde a dispersão da amostra de sandesh é maior e a da amostra de fruta laminada é menor.

A pesquisa de *P. spp.* apresenta os seguintes valores para a média e a mediana da amostra total e amostras de sandesh, saladas e fruta laminada: $4,9 \times 10^7$ ufc/g e $2,1 \times 10^6$ ufc/g, $2,9 \times 10^7$ ufc/g e $4,0 \times 10^6$ ufc/g, $7,0 \times 10^7$ ufc/g e $2,3 \times 10^6$ ufc/g, e $4,7 \times 10^7$ ufc/g e $4,7 \times 10^4$ ufc/g, respectivamente.

Os valores dos três produtos são próximos, sendo de referir que a amostra de salada apresenta o valor de CV superior, indicando uma maior dispersão dos valores centrais da amostra ordenada. Relativamente ao valor da AIQ observa-se que a amostra de fruta laminada é a que apresenta o valor mais baixo e que a amostra de sandesh é a que apresenta o valor mais elevado. Esta medida reflete a dispersão dos valores centrais da amostra ordenada, que é maior para a amostra de sandesh e menor para a de fruta.

3.2. Classificação das amostras em função do parâmetro microbiológico

A avaliação microbiológica das amostras (sandesh de pasta de atum, salada de alface e tomate, e fruta laminada) foi feita com base em valores guia e com base em valores referenciados em autores (Mattick & Donovan, 1998; Santos *et al.*, 2005; Guerzoni *et al.*, 1996; García-Gimeno & Zurera-Cosano, 1997; HPA, 2009).

Tabela 4 - Caracterização e Avaliação Microbiológica dos Produtos Prontos a Consumir

Percentagem de amostras dentro dos seguintes intervalos (%)				
Microorganismos	Produto	Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório
Mesófilos	Total	0,0	40,0	60,0
	Sandes	0,0	4,4	28,9
	Salada	0,0	13,4	20,0
	Fruta	0,0	22,2	11,1
<i>S. aureus</i>	Total	95,6	-	4,4
	Sandes	33,4	-	0,0
	Salada	31,1	-	2,2
	Fruta	31,1	-	2,2
<i>B. cereus</i>	Total	97,8	2,2	0,0
	Sandes	31,2	2,2	0,0
	Salada	33,3	0,0	0,0
	Fruta	33,3	0,0	0,0
Coliformes Totais	Total	0,0	45,2	54,8
	Sandes	0,0	0,0	33,3
	Salada	0,0	19,0	14,3
	Fruta	0,0	26,2	7,2
<i>E. coli</i>	Total	57,8	11,1	28,9
	Sandes	6,7	-	26,6
	Salada	22,2	8,9	8,9
	Fruta	28,9	2,2	2,2
<i>A. hydrophila</i>	Total	2,2	-	97,8
	Sandes	0,0	0,0	33,3
	Salada	2,2	0,0	33,2
	Fruta	0,0	0,0	33,3
<i>P. spp.</i>	Total	44,4	-	55,6
	Sandes	6,7	-	26,6
	Salada	13,3	-	20,0
	Fruta	24,4	-	9,0

No que respeita a mesófilos obtiveram-se 60% de resultados não satisfatórios, e a restante percentagem de resultados foi considerada aceitável. O produto com maior percentagem de amostras com resultados não satisfatórios foi as sandes, com 86,7%, seguido das saladas com 60%. Nos resultados das análises realizadas à fruta laminada encontrou-se 66,7% de amostras aceitáveis e apenas 33,3% não satisfatórias.

Na quantificação de *S. aureus* os resultados foram considerados satisfatórios em 95,6% e não satisfatórios em apenas 4,4% da amostra. Este último resultado corresponde a uma amostra de salada e uma de fruta laminada.

Quanto a *B. cereus* os resultados das análises foram considerados satisfatórios em 97,8% e aceitáveis em 2,2% da amostra total.

No que respeita a coliformes totais obteve-se como resultados não satisfatórios 54,8% do total da amostra, e 45,2% de resultados aceitáveis, havendo, portanto, sempre detecção deste parâmetro em todas as análises realizadas. As sandes foram o produto cujo total da amostra foi considerado não satisfatório. Relativamente às saladas, os resultados foram aceitáveis em 60,0% e não satisfatórios em 40,0%. A pesquisa deste parâmetro nas frutas laminadas revelou que 80,0% da amostra apresentou resultados aceitáveis, e apenas 20,0% foram resultados não satisfatórios.

Quanto a *E. coli*, os resultados demonstram que 28,9% das amostras foram consideradas não satisfatórias, 11,1% resultados aceitáveis, e 57,8% resultados satisfatórios. As sandes apresentam uma maior percentagem de amostras com valores considerados não satisfatórios (80,0%). Contrariamente, para as saladas e frutas, a maior percentagem de amostras foi caracterizada como satisfatória (66,7% e 86,7%, respectivamente).

Do total das amostras analisadas para *A. hydrophila* 97,8% foram consideradas não satisfatórias. Na detecção desta bactéria, por tipo de amostra, encontramos valores muito semelhantes. A totalidade das amostras de sandes e fruta laminada foram consideradas não satisfatórias e na amostra de salada obteve-se 93,3% dos resultados não satisfatórios.

A quantificação de *P. spp.* revelou que 55,6% dos resultados foram não satisfatórios. Na análise por produto, as amostras de sandes representaram 80,0% das amostras não satisfatórias e as saladas 60,0%. As frutas laminadas destacam-se com o maior número de amostras com resultados satisfatórios (73,3%).

3.3. Avaliação da Qualidade Microbiológica dos Produtos

Uma forma de avaliar a amostra total é classificá-la de acordo com a qualidade microbiológica, nomeadamente a quantidade de amostras que obtiveram resultados não satisfatórios de acordo com os valores guia utilizados (Santos *et al.*, 2005; Mattick & Donovan, 1998; Guerzoni *et al.*, 1996; García-Gimeno & Zurera-Cosano, 1997; HPA, 2009). A tabela 5 mostra a distribuição percentual da amostra total, de sandes, de salada e de fruta laminada, que obtiveram 1, 2, 3, ou mais de 4 parâmetros não satisfatórios.

Tabela 5 – Ordenação das amostras em função do número de parâmetros microbiológicos não satisfatórios

		Total	Sandes	Salada	Fruta
Amostras com 1 parâmetro	Não Satisfatórios	24,5%	0,0%	6,7%	17,8%
Amostras com 2 parâmetros	Não Satisfatórios	11,1%	0,0%	6,7%	4,4%
Amostras com 3 parâmetros	Não Satisfatórios	22,2%	4,4%	11,1%	6,7%
Amostras com 4+ parâmetros	Não Satisfatórios	42,2%	28,9%	8,9%	4,4%

De todos os alimentos analisados não houve nenhuma amostra considerada satisfatória, pois existiu sempre um parâmetro com resultado não satisfatório.

De acordo com a tabela acima, verificou-se que a amostra total obteve 24,5% das amostras com um parâmetro não satisfatório, destes 6,7% são da amostra de saladas e 17,8% são da amostra de fruta laminada. A amostra de sandes não obteve nenhuma amostra com um só parâmetro não satisfatório.

Quando analisadas as amostras para dois parâmetros não satisfatórios observou-se uma diminuição na percentagem total (11,1%), para este contribuiu uma diminuição no número das amostras de fruta laminada (4,4%). De novo a amostra de sandes não obteve amostras com apenas dois parâmetros não satisfatórios.

Relativamente a amostras com três parâmetros não satisfatórios observou-se um aumento na percentagem total, 22,2%, que ficaram distribuídas pelos 3 produtos, contribuindo a salada com metade deste valor (11,1%).

Nas amostras com quatro ou mais parâmetros não satisfatórios verificou-se um aumento acentuado na percentagem total, sendo o produto que mais contribuiu as sandes, com 28,9% de 32,2%. Enquanto a amostra de saladas manteve o valor percentual de parâmetros não satisfatórios (8,9%), a amostra de fruta laminada voltou a diminuir esse valor (4,4%).

Discussão

Quando comparados a estudos presentes na literatura, os resultados obtidos neste trabalho apresentam em alguns aspectos valores semelhantes (Christison, Lindsay & Von Holy, 2007), contudo a maioria revela valores diferentes (Zhuang, Barth & Hankinson, 2003; Fang, Wei, Liao, Hung & Wang, 2003; Valero, Hernández-Herrero & Giner, 2007; Berrang & Brackett, 1989).

Na contagem de colónias de mesófilos obtiveram-se resultados que variaram entre: $3,9 \times 10^2$ ufc/g a $9,6 \times 10^7$ ufc/g nas sandes; $1,2 \times 10^5$ ufc/g a $2,8 \times 10^9$ ufc/g nas saladas; e $2,2 \times 10^4$ ufc/g a $2,8 \times 10^9$ ufc/g na fruta laminada.

De acordo com Zhuang *et al.* (2003) o número de mesófilos presente em vegetais cortados varia entre $1,0 \times 10^4$ ufc/g e $1,0 \times 10^6$ ufc/g, e para fruta laminada entre $1,0 \times 10^2$ ufc/g e $1,0 \times 10^5$ ufc/g, de acordo com o produto, a época do ano e a região onde é cultivado. Um estudo efectuado em Joanesburgo, na África do Sul, obteve valores na pesquisa de mesófilos de $1,0 \times 10^7$ ufc/g em saladas de vegetais, $1,0 \times 10^5$ ufc/g em saladas de fruta laminada, e $1,0 \times 10^7$ ufc/g em sandes com pastas de carne e queijo (Christison *et al.*, 2007). Assim, no presente estudo verificou-se uma diferença de mais duas ordens de magnitude logarítmica em relação aos estudos acima mencionados, para a fruta laminada e as saladas. Apenas nas sandes os resultados se assemelharam.

Estas diferenças podem justificar-se pela má lavagem e desinfecção dos produtos. No caso específico da alface, a lavagem com hipoclorito de sódio (70 ppm) ou permanganato de potássio (25 ppm) poderia diminuir-lhe a quantidade da população microbiana, em duas ordens de magnitude logarítmica (Soriano, Rico, Moltó & Mañez, 2000). Igualmente podem-se justificar estes resultados pela baixa qualidade do ar dos locais de processamento e de exposição (Salustiano *et al.*, 2003).

Na pesquisa de *S. aureus* para a amostra de sandes, no presente trabalho, obteve-se a totalidade das amostras com resultados satisfatórios. As amostras de saladas e fruta laminada obtiveram valores de contaminação de $4,0 \times 10^2$ ufc/g e $1,0 \times 10^2$ ufc/g, respectivamente.

No estudo de Christison *et al.* (2007) a contaminação de sandes, saladas e frutas foi de, respectivamente, $1,0 \times 10^2$ ufc/g, $1,0 \times 10^1$ ufc/g e $1,0 \times 10^1$ ufc/g revelando semelhanças entre estudos apenas nos valores das saladas de vegetais. Em Fang *et al.* (2003), nas sandes o número de bactérias presentes foi de $2,0 \times 10^2$ ufc/g a $1,2 \times 10^5$ ufc/g, e nas saladas foi de $4,0 \times 10^2$ ufc/g a $1,2 \times 10^5$ ufc/g, valores superiores em mais do que duas ordens de magnitude logarítmica ao do presente estudo.

A diferença entre o presente estudo e os estudos referidos poderá significar a existência de boas práticas de manipulação, e de limpeza e desinfecção, dificultando a contaminação cruzada (Fang *et al.*, 2003). Igualmente, poderá justificar-se pelas temperaturas baixas de armazenamento e exposição em que os alimentos são mantidos, evitando, assim, a proliferação destas bactérias (FDA, 2005). Outro aspecto, que pode ter contribuído para a inibição do seu crescimento é a presença concomitante de *P. spp.*, *A. hydrophila* e/ou *Lactobacillus*, que competem pelos nutrientes e modificam as condições ambientais tornando-as menos favoráveis (Jay, 2000).

Na pesquisa de *B. cereus* a amostra de sandes obteve valores de contaminação entre $1,0 \times 10^2$ ufc/g e $2,0 \times 10^2$ ufc/g. Para a amostra de saladas e fruta obtiveram-se valores de contaminação de $1,0 \times 10^1$ ufc/g e $1,0 \times 10^2$ ufc/g, respectivamente.

Em estudos semelhantes ao presente, verificaram-se valores superiores de contaminação de *B. cereus*, até quatro ordens de magnitude logarítmica. Contudo, os três produtos tiveram valores semelhantes de contaminação, podendo significar que a origem das bactérias é telúrica (Valero *et al.*, 2007). Igualmente, a origem da contaminação dos alimentos poderá ter ocorrido através do ar, devido à incorrecta exposição dos alimentos verificada no estabelecimento. As contagens elevadas de *B. cereus* são encontradas em produtos com amido e processados termicamente, que no presente estudo se encontravam em pequena quantidade (Rosenquist, Smidt, Andersen, Jensen & Wilcks, 2005).

Nos resultados da pesquisa de coliformes totais para a amostra sandes as contagens variaram no intervalo de $2,9 \times 10^3$ ufc/g a $6,1 \times 10^6$ ufc/g. Para a amostra de salada obtiveram-se valores que variaram entre $4,7 \times 10^3$ ufc/g e $5,1 \times 10^6$ ufc/g. O intervalo de variação dos valores para a amostra de fruta laminada variou entre $3,4 \times 10^3$ ufc/g a $5,3 \times 10^4$ ufc/g. O estudo de Christison *et al.* (2007) suporta estes resultados, com excepção das saladas, encontrando-se no presente estudo, uma ordem de magnitude logarítmica inferior.

Esta diferença de resultados poderá estar relacionada com o facto destas bactérias ocorrerem naturalmente no ambiente, e a lavagem dos vegetais e frutas não ter sido eficaz. Por outro lado, os coliformes totais são também indicadores da higiene das superfícies de contacto, como tábuas de corte e mãos dos manipuladores (Soriano *et al.*, 2000).

A pesquisa de *E. coli*, na amostra de areias revelou um intervalo de contaminação mínima inferior a $1,0 \times 10^1$ ufc/g, e máxima de $6,1 \times 10^2$ ufc/g. O valor de contaminação mínima para a amostra de salada foi inferior a $1,0 \times 10^1$ ufc/g e a máxima foi de $1,1 \times 10^3$ ufc/g. A amostra de fruta apresentou valores de contaminação inferiores a 10 ufc/g e no máximo obteve contagens de $1,1 \times 10^2$ ufc/g.

Estes valores relativamente a outros estudos realizados a refeições prontas a consumir, mostrou que se obtiveram valores de contaminação menores, com diferença até três ordens de magnitude logarítmica nas areias, seis nas saladas de vegetais e quatro na fruta (Fang *et al.*, 2003; Christison *et al.*, 2007). Ainda assim, a presença desta bactéria poderá traduzir contacto dos alimentos com superfícies contaminadas dos equipamentos e mãos dos manipuladores (Caponigro *et al.*, 2010). Igualmente, alguns fungicidas e insecticidas permitem a sobrevivência e crescimento desta bactéria, assim, como da *P. spp.* O pesticida ou a água utilizada na sua diluição são as próprias fontes da contaminação, sendo o armazenamento prolongado e as temperaturas elevadas favorecedores do crescimento bacteriano (Ng, Fleet & Heard, 2005).

A amostra de areias na pesquisa de *A. hydrophila* obteve um intervalo de contaminação de $2,0 \times 10^2$ ufc/g a $2,2 \times 10^6$ ufc/g. Para a amostra de salada obteve resultados que variaram entre $3,0 \times 10^2$ ufc/g e $1,1 \times 10^6$ ufc/g. A amostra de fruta laminada obteve como intervalo de valores de contaminação de $1,0 \times 10^2$ ufc/g e $1,7 \times 10^6$ ufc/g.

Para vegetais como espargos, brócolos e couve-flor frescos, Berrang & Brackett, (1989) registou entre $1,0 \times 10^4$ ufc/g a $1,0 \times 10^5$ ufc/g. Noutro estudo de García-Gimeno, Sanchez-Pozo, Amaro-López e Zurera-Cosano (1996) observou-se que, as amostras das saladas de vegetais (alface, cenoura e couve roxa) mantidas a 4°C, e embaladas em atmosfera modificada, tinham uma contaminação média de $1,0 \times 10^3$ ufc/g a $1,0 \times 10^4$ ufc/g, e nas amostras mantidas a 15°C que foram inoculadas com $1,0 \times 10^3$ ufc/g após 24 horas a contaminação aumentou para $1,0 \times 10^7$ ufc/g.

O tempo de armazenamento poderá estar relacionado com estes resultados, uma vez que o crescimento destas bactérias é directamente proporcional ao tempo durante o qual elas permanecem armazenadas (Berrang & Brackett, 1989). Igualmente, o aumento da temperatura contribui para o crescimento do número de bactérias (García-Gimeno *et*

al., 1996). A má qualidade da água de irrigação poderá, também, ser a fonte da contaminação dos produtos (Jay, 2000).

Na pesquisa de *P. spp.* verificou-se que os resultados obtidos variaram entre $2,0 \times 10^3$ ufc/g e $2,3 \times 10^8$ ufc/g para a amostra de sandes; entre $2,2 \times 10^4$ ufc/g a $4,8 \times 10^8$ ufc/g para a amostra de saladas; e entre $4,1 \times 10^3$ ufc/g e $2,6 \times 10^8$ ufc/g para a amostra de fruta laminada.

Um estudo de Fang *et al.* (2003) em refeições prontas a consumir, obteve como resultado para *P. spp.* $2,0 \times 10^2$ ufc/g a $2,1 \times 10^5$ ufc/g para vegetais, e $2,0 \times 10^2$ ufc/g a $1,2 \times 10^6$ ufc/g para sandes, o que representa uma contaminação mais baixa do que a encontrada no presente trabalho. García-Gimeno (1997) realizaram um estudo em que as contagens iniciais para bactérias psicrotróficas em saladas conservadas a 4° foram $1,07 \times 10^5$ ufc/g. Após armazenamento durante 204h estas bactérias aumentaram os seus valores de contagem em duas ordens de magnitude logarítmica, valor mais próximo do máximo encontrado no presente trabalho.

A contaminação dos produtos pode estar relacionada com a má qualidade da água de irrigação, uma vez que são bactérias de origem aquática. Igualmente, como estamos perante produtos com elevado a_w , que conjugado com uma atmosfera normal e temperaturas não suficientemente baixas de armazenamentos favorecem a multiplicação destas bactérias (Jay, 2000; Easa, 2010). Também, durante a fase de cultivo dos produtos existe a possibilidade da sobrevivência e proliferação de *P. spp.* com o uso de alguns insecticidas e fungicidas (Ng *et al.*, 2005).

Desta forma, o momento durante o processo em que o alimento é contaminado torna-se essencial, porque as medidas de controlo são mais eficazes quando direccionadas, de modo a reduzir a contaminação na origem. Para assegurar e manter o alimento saudável deverão ser aplicadas medidas, que englobem todos os passos do processo pelos quais os produtos passam, desde a produção, processamento, distribuição e consumo. Igualmente crucial é alertar e instruir os consumidores na forma como guardar e manipular os alimentos (Taban & Halkman, 2001).

Verifica-se, desta forma, uma grande diversidade de fontes de contaminação dos alimentos, que podem ter como consequência toxinfecções alimentares para os consumidores. Assim, é necessário tomar medidas para que o risco seja cada vez menor, investindo em novos métodos de redução ou eliminação dos microrganismos. Foi

demonstrado que tratamentos de higienização industrial não garantem a eliminação total de agentes patogénicos, quando estes estão presentes (Abadias, Alegre, Oliveira, Altisent & Viñas, 2012). Igualmente, tratamentos com água com cloro (0,1 a 0,5 mg/l de cloro) não mostrou efeito significativo na sobrevivência de *A. hydrophila*, sendo necessárias concentrações de 0,95 ppm para reduzir eficazmente a presença desta bactéria (Uyttendaele, Neyts, Vanderswalmen, Notebaert, & Debevere, 2004).

Novos métodos estão a ser testados, e já com algum sucesso, como é o exemplo de Trias, Bañeras, Badosa e Montesinos (2008), que usaram bactérias lácteas, como agentes bioprotectores, contra o crescimento de agentes patogénicos em refeições prontas a consumir com vegetais e frutas. Contudo, é necessário aprofundar esta opção, através de mais investigação, de forma a ter uso comercial, e até, eventualmente, poder ser aplicado para extensão da validade dos produtos.

As unidades que fornecem refeições prontas a consumir deverão seguir os seguintes requisitos de forma a assegurarem a qualidade dos produtos que comercializam:

- 1) Ter planos de higiene estabelecidos e controlados;
- 2) Assegurar a higiene pessoal dos colaboradores, pelo fornecimento de fardamento, balneários, zonas de lavagem de mãos, e formação;
- 3) Implementar regras de armazenamento adequado, assegurando a correcta temperatura das câmaras frigoríficas e a circulação do ar;
- 4) Ter fornecedores qualificados e de confiança;
- 5) Ter as instalações organizadas através de fluxos de trabalho, separação das zonas, de forma a evitar contaminação cruzada entre produtos crus e confeccionados.

O presente estudo levanta como possíveis hipóteses de futuras investigações, a averiguação da fonte de contaminação dos alimentos. Seria adequado fazer um maior número de análises aos produtos, igualmente, dever-se-iam realizar análises a superfícies de trabalho, utensílios, e mãos dos manipuladores, e relacionar a contaminação com o tempo e temperatura de armazenamento e de exposição. Também, se poderia efectuar um questionário aos clientes, investigando as condições de conservação desses alimentos e tempo decorrido até ao consumo das refeições. O conjunto destes estudos permitiria aprofundar o conhecimento da fonte de contaminação dos alimentos, contribuiria para melhorar as suas condições de higiene e sanitárias, e

permitiria a implementação de métodos que favoreceriam a melhoria do sistema de HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*). O resultado final e desejável seria o fornecimento de refeições prontas a consumir não contaminadas, sem perigo para a saúde pública, e contribuiriam definitivamente para o estabelecimento de valores guia.

Conclusão

Numa avaliação geral das contagens obtidas para os diferentes parâmetros analisados, a totalidade das amostras pode ser considerada não satisfatória. De igual forma, aproximadamente metade (42,2%) das amostras obteve resultados não satisfatórios em 4 ou mais parâmetros analisados. Desta percentagem, cerca de três quartos (28,9%) pertencem à amostra do produto sandes.

Os resultados obtidos para os mesófilos revelaram uma qualidade geral má, uma vez que mais de metade dos resultados foram considerados não satisfatórios para a amostra total. Destes, a maioria pertence à amostra de sandes. Esta percentagem elevada pode justificar-se pela não eliminação destes microrganismos durante a preparação dos alimentos ou contaminação durante a manipulação.

No que respeita aos microrganismos potencialmente patogénicos como *S. aureus* e *B. cereus* os resultados foram considerados bons, com uma percentagem diminuta das amostras considerada não satisfatória para *S.aureus*, o que traduz boas práticas de manipulação, como utilização de luvas, lavagem e desinfecção das mãos. Os resultados para *B. cereus* foram, na quase totalidade, considerados satisfatórios, o que revela não contaminação ambiental dos produtos durante a fase de produção, traduzindo uma boa escolha de fornecedores.

Podemos considerar que para *E. coli*, que apresentou 28,9% de não satisfatórios, os resultados foram maus. Estes resultados são indicadores de contaminação fecal durante a fase de produção, eventualmente devido a águas de irrigação e/ou dos solos. Porém, se relacionarmos com os valores dos resultados dos coliformes totais, em que mais de metade foram não satisfatórios para a amostra total, podem indicar falha na desinfecção dos produtos, más práticas de manipulação, cruzamento de circuitos, contaminação cruzada, como utilização da mesma tábua para corte de produtos diferentes.

Relativamente aos resultados para *A. hydrophila*, quase a totalidade da amostra foi considerada não satisfatória, que indica uma má qualidade da água de irrigação, denunciando más operações de desinfecção dos alimentos. O período de armazenamento dos produtos poderá também estar na origem das elevadas contagens desta bactéria.

No que respeita aos resultados para *P. spp.*, mais de metade da amostra total foi considerada não satisfatória, estando nesta percentagem incluídas mais de três quartos

(26,6%) das amostras de sandes e mais de metade (20,0%) das amostras de saladas Na origem destes resultados pode estar a má qualidade das águas.

Nos produtos prontos a consumir estudados, apesar da existência de muitas amostras com vários parâmetros não satisfatórios, deve-se salientar que a probabilidade destes microrganismos causarem doença num adulto saudável é baixa. No entanto, será de grande importância advertir os consumidores de grupos mais vulneráveis para o perigo de contrair doença com o consumo deste tipo de alimentos. Desta forma poder-se-á considerar os valores guia para uma população saudável pouco exequíveis e provavelmente irrealistas, no entanto, universalmente desejáveis.

Bibliografia

- Abadias, M., Alegre, I., Oliveira, M., Altisent, R., & Viñas, I. (Março de 2012). Growth potential of *Escherichia coli* 0157:H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrots and escarole) stored under different conditions. *Food Control*, pp. 37-44.
- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (Março de 2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123, pp. 121-129.
- Al-Dagal, M., Mo, O., Fung, D., & Kastner, C. (1992). A case study of the influence of microbial quality of air on product shelf life in a meat processing plant. *Journal of Dairy Food and Environment Sanitation*, 12, pp. 69-70.
- Anónimo. (1987). Violet Red Bile (VRB) Agar. *International Journal of Food Microbiology*, 5, pp. 282-284.
- ANZFA. (2001). *Food Safety Practices and General Requirements* (Standard 3.2.2). Recuperado em Novembro 16, 2011, de Australia New Zealand Food Authority (ANZFA) Web site: <http://www.comlaw.gov.au/Details/F2011C00591/Download>
- Bergoll, M. S., & Wong, A. C. (2006). Staphylococcal intoxications. In H. P. Riemann, & D. O. Cliver (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications* (3rd ed.) (pp. 523-562). Londres: Elsevier.
- Bernardo, F. (2009). *Epidemiologia*. Estoril: Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril.
- Berrang, M., & Brackett, R. (Setembro de 1989). Growth of *Aeromonas hydrophila* on Fresh Vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, pp. 2167-2171.
- Biokar Diagnostics (12 de Janeiro de 2010). Catalogue [em linha]. *Salabia Diagnostics*. Acedido Agosto 20, 2011, em http://www.biokar-diagnostics.com/solabia/solabiadiagnostique.nsf/VS_OPM/4B41E68777E5B70AC125748E004A611F?OpenDocument.
- Caponigro, V., Ventura, M., Chiancone, I., Amato, L., Parente, E., & Piro, F. (Dezembro de 2010). Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer. *Food Microbiology*, 27, pp. 1071-1077.
- CDC (7 de Fevereiro de 2011a). CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States [em linha]. *Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Web site*. Acedido Fevereiro 24, 2012, em <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>.
- CDC (25 de Abril de 2011b). Tips to reduce your risk of Salmonella from eggs [em linha]. *Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Web site*. Acedido Março 7, 2012, em <http://www.cdc.gov/Features/SalmonellaEggs/>.
- CDC (24 de Fevereiro de 2012). Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O26 Infections Linked to Raw Clover Sprouts at Jimmy John's Restaurants [em linha]. *Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Web site*. Acedido Março 7, 2012, em <http://www.cdc.gov/ecoli/2012/O26-02-12/index.html>.
- Christison, C., Lindsay, D., & Von Holy, A. (25 de Julho de 2007). Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. *Food Control*, 19, pp. 727-733.
- Codron, J., Grunert, K., Giraus-Heraud, E., Soler, L., & Regmi, A. (2005). Retail Sector Responses to Changing Consumer Preferences - The European Experience. In Regmi, a. & Gehlhar, M. (Eds.), *New Directions in Global Food Markets* (Agriculture Information Bulletin Number 794) (pp. 32-33). Washington DC: United States Department of Agriculture.

- Costa, A., Schoolmeester, D., Dekker, M., & Jøgen, W. (2007). To cook or not to cook: A means-end study of motives for choice of meal solutions. *Food Quality and Preference*, 18, pp. 77-88.
- Cristino, J. (2000). Staphylococcus. In W. Ferreira, & J. de Sousa (Eds.), *Microbiologia* (pp. 39-44). Lisboa: Lidel.
- Crook, P., Aguilera, J., Threlfall, E., O'Brien, S., Sigmundsdóttir, G., Wilson, D., . . . Widdowson, M. (26 de Agosto de 2003). A European outbreak of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium definitive phage type 204b in 2000. *Clinical Microbiology and Infection*, 8, pp. 839-845.
- CSPI (2012). Outbreak Alert [em linha]. *Center for Science in the Public Interest (CSPI) Web site*. Acedido Fevereiro 26, 2012, em: http://www.cspinet.org/foodsafety/outbreak_report.html.
- de Sousa, J. (2000). Enterobacteriaceae. In W. Ferreira, & J. de Sousa, *Microbiologia* (pp. 99-102). Lisboa: Lidel.
- Ducel, G., Fabry, J., Nicolle, L., Girard, R., Perraud, M., Prüss, A., . . . Vanhems, P. (2002). *Prevention of hospital-acquired infections - A practical guide* (WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12). Recuperado em Fevereiro 25, 2012, de World Health Organization (WHO) Web site: <http://www.who.int/csr/resources/publications/whocdscsreph200212.pdf>.
- WHO. (2006). *Five Keys to Safer Food Manual* (NLM classification: WA 695). Recuperado em Outubro 7, 2012, de World Health Organization (WHO) Web site: http://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys.pdf
- Easa, S. (2010). Microorganisms Found in Fast and Traditional Fast Food. *Journal of American Science*, 6, pp. 515-531.
- Ethelberg, S., Lisby, M., Böttiger, B., Schultz, A., Villif, A., Jensen, T., . . . Müller, L. (11 de Fevereiro de 2012). Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010 [em linha]. *Eurosurveillance Web site*. Acedido Fevereiro, 28, 2012, em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19484>.
- Fang, T., Wei, Q., Liao, C., Hung, M., & Wang, T. (2003). Microbiological quality of 18°C ready-to-eat food products sold in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, 80, pp. 241-250.
- FDA (23 de Março de 2007). News and Events [em linha]. *U.S Food and Drug Administration (FDA) Web site*. Acedido Fevereiro 24, 2012, em <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108873.htm>
- FDA (7 de Outubro de 2009). The Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook [em linha]. *U.S Food and Drug Administration Web site*. Acedido Agosto 17, 2011, em <http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/ucm071284.htm>.
- Fluka Analytical (2007). 17118 Aeromonas Isolation Agar (Base) [em linha]. *Sigma Aldrich Switzerland Web site*. Acedido Setembro 28, 2012. Acedido em <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Fluka/Datasheet/17118dat.Par.0001.File.tmp/17118dat.pdf>.
- Foot, R., Jess, M., & Remley, D. (2009). Fact Sheet: Canning Basics [em linha]. *The Ohio State University Web site*. Acedido Março 6, 2012, em <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/5000/pdf/5338.pdf>
- Francis, G. G., Thomas, C., & O'Beirne, T. (1999). The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 1-22.

- Fraser, A. (2008). Take Safety on Your Picnic [em linha]. *North Carolina Cooperative Extension Web site*. Acedido Março 7, 2012, em <http://www.ces.ncsu.edu/depts/foodsci/ext/pubs/picnic.html>.
- Fratamico, P. M., & Smith, J. L. (2006). *Escherichia coli* infections. In H. P. Riemann, & D. O. Cliver (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications* (3rd ed.) (pp. 205-258). London: Elsevier.
- Friesema, I., Sigmundsdottir, G., van der Zwaluw, K., Heuvelink, A., Schimmer, B., de Jager, C., . . . van Pelt, W. (11 de Dezembro de 2008). *An international outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 infection due to lettuce, September – October 2007*. Obtido em 28 de Fevereiro de 2012, de Eurosurveillance: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19065>
- Frost, J., McEvoy, M., Bentley, C., Andersson, Y., & Rowe, B. (1995). An outbreak of *Shigella sonnei* infection associated with consumption of iceberg lettuce. *Emerging Infectious Diseases*, 1, pp. 26-28.
- García-Gimeno, R., & Zurera-Cosano, G. (1997). Determination of ready-to-eat vegetable salad shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 36, pp. 31-38.
- García-Gimeno, R., Sanchez-Pozo, M., Amaro-López, M., & Zurera-Cosano, G. (1996). Behaviour of *Aeromonas hydrophila* in vegetables salads stored under modified atmosphere at 4 and 15°C. *Food Microbiology*, 13, pp. 369-374.
- Garg, N., Churey, J. J., & Splittstoesser, D. F. (1990). Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *Journal of Food Protection*, 52, 701-703.
- Geeroms, N., Verbeke, W., & Kenhove, P. (2008). Consumers' health-related motive orientation and ready meal consumption behavior. *Appetite*, 51, pp. 704-712.
- Guerzoni, M., Gianotti, A., Corbo, M., & Sinigaglia, M. (1996). Shelf-life modelling for fresh-cut vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 9, pp. 165-207.
- Hajmeer, M. N., & Fung, D. Y. (2006). Infections with other bacteria. In H. P. Riemann, & D. O. Cliver (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications* (3rd ed.) (pp. 341-343). London: Elsevier.
- Horby, P., O'Brien, S., Adak, G., Graham, C., Hawker, J., Hunter, P., . . . Ward, L. (2003). A national outbreak of multi-resistant *Salmonella* enterica serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. *Epidemiology & Infection*, 130, pp. 169-178.
- HPA (6 de Março de 2003). Outbreak of *Salmonella Braenderup* focused in West Midlands [em linha]. *Commun Dis Rep CDR Weekly*. Acedido Fevereiro 26, 2012, em <http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/2003/cdr1003.pdf>.
- HPA (2 de Dezembro de 2004). Update on national outbreak of *Salmonella newport* infection [em linha]. *Commun Dis Rep CDR Weekly*. Acedido Fevereiro 26, 2012, em <http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/archive04/news/news4904.htm#newport>.
- HPA (2005). Outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT104 infection in Scotland, England & Wales, January to February 2005 (update) [em linha]. *Commun Dis Rep CDR Weekly*. Acedido Fevereiro 26, 2012, em <http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/2005/cdr0905.pdf>.
- HPA. (2009). *Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods*. Recuperado em Março 6, 2011, de Health Protection Agency (HPA) Web site: http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1259151921557
- HPA (13 de Maio de 2011). *Campylobacter* now the leading cause of general foodborne outbreaks in England and Wales [em linha]. *Health Protection Agency Web site*. Acedido Fevereiro 26, 2012, em <http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2011/news1911.htm#efoss>.

- HPA (10 de Fevereiro de 2012). Hospital norovirus outbreaks (England and Wales, weeks 32-35/2012) and seasonal comparisons of recent years norovirus laboratory reports [em linha]. *Health Protection Agency Web site*. Acedido Fevereiro 26, 2012, em <http://www.hpa.org.uk/hpr/infections/enteric.htm#gofi>.
- Jay, J. M. (2000). *Modern Food Microbiology* (6th ed.). Gaithsburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- Lab M Limited (Setembro de 2006). *Pseudomonas Agar Base* [em linha]. *Lab M*. Acedido Setembro 28, 2012, em <http://www.labm.com/products/pseudomonas-agar-base/>.
- Lerner, K., & Lerner, B. (Eds.) (2003). *World of Microbiology and Immunology*. Detroit: Gale.
- Little, C., & Gillespie, I. (4 de Abril de 2008). Prepared salads and public health. *Journal of Applied Microbiology*, 105, pp. 1733-1734.
- Littlewood, J. (2007). The environment as a source of *Pseudomonas aeruginosa* and some other potential CF pathogens [em linha]. *Cystic Fibrosis Trust Web site*. Acedido Fevereiro 27, 2012, em http://www.cftrust.org.uk/aboutcf/publications/Pseudomonas_article_-_Jim_Sept_07_.pdf.
- Lopes, J. A. (2000). *Bacillus*. In W. F. Ferreira, & J. C. Sousa (Eds.), *Microbiologia* (pp. 71-74). Lisboa: Lidel.
- Lund, B., Baird-Parker, T., & Gould, G. (2000). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- Lund, J. F., Glass, R. E., Cohen, I. P., Bern, C., & Moe, C. L. (1986). Anaerobes in relation to foods of plant origin. In E. M. Barnes, & G. C. Mead (Eds.), *Anaerobic Bacteria in Habitats other than Man* (pp. 351-372). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Mason, B., Williams, N., Salmon, R., Lewis, A., Price, J., Johnston, K., & Trott, R. (2001). Outbreak of *Salmonella indiana* associated with egg mayonnaise sandwiches at an acute NHS hospital. *Communicable Disease and Public Health*, 4, pp. 300-304.
- Mattick, K., & Donovan, T. (1998). Optimisation of the protocol for detection of *Aeromonas* species in ready-to-eat salads, and its use to speciate isolates and establish their prevalence. *Communicable Disease and Public Health*, Vol I, N°4, pp. 263-270.
- Meldrum, R., Little, C., Saggo, S., Mithani, V., McLauchin, J., & de Pinna, E. (Setembro de 2009). Assessment of the microbiological safety of salad vegetables and sauces from kebab take-away restaurants in the United Kingdom. *Food Microbiology*, 26, pp. 573-577.
- Mukherjee, A., Speh, D., Jones, A., Buesing, K., & Diez-Gonzalez, F. (2006). Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper Midwest. *Journal of Food Protection*, 69, pp. 1928-1936.
- Ng, P., Fleet, G., & Heard, G. (Maio de 2005). Pesticides as a source of microbial contamination of salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 101, pp. 237-250.
- Nicolay, N., McDermott, R., Kelly, M., Gorby, M., Prendergast, T., Tuite, G., . . . Sayers, G. (28 de Julho de 2011). Potential role of asymptomatic kitchen food handlers during a food-borne outbreak of norovirus infection, Dublin, Ireland, March 2009 [em linha]. *Eurosurveillance Web site*. Acedido Março 7, 2012, em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19931>.

- Oxoid Limited (2010). Browse Products by Organism [em linha]. *Oxoid Web site*. Acedido Agosto 20, 2011, em http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0559&org=152&c=UK&lang=EN.
- Regulamento (CE) 2073/2005 de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, *Jornal Oficial da União Europeia L 338/1*. Comissão das Comunidades Europeias. Bruxelas.
- Rosenquist, H., Smidt, L., Andersen, S., Jensen, G., & Wilcks, A. (Setembro de 2005). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat foods. *FEMS Microbiology Letters*, 250, pp. 129-136.
- Salustiano, V., Andrade, N., Brandão, S., Azevedo, R., & Lima, S. (2003). Microbiological Air Quality of Processing areas in a Dairy Plant as Evaluated by the Sedimentation Tecnique and a One-Stage Air Sampler. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, pp. 255-259.
- Samuel, N. (1984). *Le temps libre: un temps social*. Paris: Librairie des Meridiens.
- Santos, M., Correia, C., Cunha, M., Saraiva, M., & Novais, M. (2005). Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Revista da Ordem dos Farmacêuticos*, 64, pp. 66-68.
- SCF. (2002). *Risk Profile on the Microbiological Contamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw* (Report of the Scientif committee on Food). Recuperado em Junho 2, 2011, de European Commission Web site: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out125_en.pdf
- Shetty, A., McLauchlin, J., O'Brien, D., Howard, T., & Davies, E. (17 de Março de 2009). Outbreak of *Listeria monocytogenes* in an oncology unit associated with sandwiches consumed in hospital. *Journal of Hospital Infection*, 72, pp. 332-336.
- Söderstrom, A., Lindberg, A., & Andersson, Y. (2005). EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005 [em linha]. *EuroSurveillance Web site*. Acedido a Fevereiro 28, 2012, em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2794>.
- Soriano, J., Rico, H., Moltó, J., & Mañez, J. (Junho de 2000). Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. *International of Food Microbiology*, 58, pp. 123-128.
- State Laboratory of the Canton Basel City (2002). Vegetables and salads from catering establishments / microbiological quality [em linha]. *Kantonaes Laboratorium Web site*. Acedido Fevereiro 28, 2012, em <http://www.kantonslaborbs.ch/files/berichte/Report58.pdf>.
- Taban, B., & Halkman, A. (Dezembro de 2001). Do leafy green vegetables and their ready-to-eat (RTE) salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, 17, pp. 286-287.
- Takkinen, J., Nakari, U., Johansson, T., Niskanen, T., Siitonen, A., & Kuusi, M. (30 de Junho de 2005). A nationwide outbreak of multiresistant *Salmonella* Typhimurium var Copenhagen DT104B infection in Finland due to contaminated lettuce from Spain, May 2005 [em linha]. *Eurosurveillance Web site*. Acedido Fevereiro 27, 2012, em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2734>.
- Tauxe, R., Kruse, H., Hedberg, C., Potter, M., Madden, J., & Wachsmuth, K. (1997). Microbial hazards and emerging issues associated with produce. A preliminary report to the national advisory committee on microbiological criteria for foods. *Journal of Food Protection*, 60, pp. 1400-1408.

- The British Sandwich Association (2007). Home [em linha]. *The British Sandwich Association Web site*. Acedido Fevereiro 29, 2012, em <http://www.sandwich.org.uk/>.
- Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., & Montesinos, E. (Março de 2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123, pp. 50-60.
- Uyttendaele, M., Neyts, K., Vanderswalmen, H., Notebaert, E., & Debevere, J. (Fevereiro de 2004). Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chloriated water, or thyme essential oil solution. *International Journal of Food Microbiology*, 90, pp. 263-271.
- Valero, M., Hernández-Herrero, L., & Giner, M. (Outubro-Dezembro de 2007). Survival, isolation and characterization of a psychrotrophic *Bacillus cereus* strain from a mayonnaise-based ready-to-eat vegetable salads. *Food Microbiology*, 26, pp. 671-677.
- Ward, L., Maguire, C., Hampton, M., de Pinna, E., Smith, H., Little, C., . . . Threlfall, E. (Dezembro de 2002). Collaborative investigation of an outbreak of *Salmonella enterica* serotype *newport* in England and Wales in 2001 associated with ready-to-eat salad vegetables. *Commun Dis Public Health*, 5, pp. 301-304.
- WHO. (2006). *Five Keys to Safer Food Manual* (NLM classification: WA 695). Recuperado em Outubro 7, 2012, de World Health Organization (WHO) Web site: http://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys.pdf
- Zhuang, H., Barth, M., & Hankinson, T. (2003). Microbiology safety, quality and sensory aspects of fresh-cut fruits and vegetables. In J. Novak, G. Sapers, & V. Juneja (Eds.), *Microbial safety of minimal processed foods*. (pp. 255-278). Boca Raton, Flórida: CRC Press.